

# 苹果 MdMYB10 启动子甲基化修饰对果皮花青苷合成的表观调控机制

刘致远

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 苹果果皮色泽是评价果实品质的核心指标之一, 其主要由花青苷的积累量决定, 而MdMYB10基因作为转录因子, 在花青苷合成途径中发挥核心调控作用。DNA甲基化作为一种重要的表观遗传修饰方式, 可在不改变基因序列的前提下调控基因表达, 进而影响植物次生代谢过程。本研究以不同色泽苹果品种为试材, 采用重亚硫酸盐测序 (BS-Seq)、实时荧光定量PCR (qRT-PCR)、高效液相色谱 (HPLC) 等技术, 系统检测MdMYB10启动子甲基化水平、基因表达量及果皮花青苷含量, 分析三者之间的相关性; 通过生物信息学分析预测MdMYB10启动子顺式作用元件, 筛选影响基因表达的关键甲基化位点, 并采用基因编辑技术验证其功能。结果表明, MdMYB10启动子甲基化水平与基因表达量、花青苷含量呈显著负相关, 启动子区域的CHG类型甲基化修饰对基因表达的抑制作用最为明显; 不同组织、不同发育时期及不同环境处理下, MdMYB10启动子甲基化水平存在显著差异, 且与花青苷积累规律高度契合; 筛选获得3个关键甲基化位点, 定点去甲基化处理后可显著提高MdMYB10基因表达量和花青苷含量。本研究明确了MdMYB10启动子甲基化修饰对苹果果皮花青苷合成的表观调控机制, 为苹果色泽品质的分子改良提供了理论依据和技术支撑。

**关键词:** 苹果; MdMYB10基因; 启动子; DNA甲基化; 花青苷; 表观调控

中图分类号: S661.1

文献标识码: A

文章编号: 3106-2547 ( 2025 ) 02-0024-12

DOI: 10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.02.003

## Epigenetic Regulation Mechanism of Methylation Modification of Apple MdMYB10 Promoter on Pericarp Anthocyanin Synthesis

Liu Zhiyuan

(College of Horticultural Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018)

**Abstract:** The color of apple pericarp is one of the core indicators for evaluating fruit quality, which is mainly determined by the accumulation of anthocyanins. The MdMYB10 gene, as a transcription factor, plays a central regulatory role in the anthocyanin synthesis pathway. DNA methylation, as an important epigenetic modification method, can regulate gene expression without changing the gene sequence, thereby affecting the secondary metabolic process of plants. In this study, different apple varieties with different colors were used as test materials. Bisulfite Sequencing (BS-Seq), quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and other technologies were used to systematically detect the methylation level of MdMYB10 promoter, gene expression level and pericarp anthocyanin content, and analyze the correlation among the three. The cis-acting elements of MdMYB10 promoter were predicted by bioinformatics analysis, the key methylation sites affecting gene expression were screened, and their functions were verified by gene editing technology. The results showed that the methylation level of MdMYB10 promoter was significantly negatively correlated with gene expression level and anthocyanin content, and the CHG type methylation modification in the promoter region had the most obvious inhibitory effect on gene expression. There were significant differences in the methylation level of MdMYB10 promoter in different tissues, different developmental stages and different environmental treatments, which was highly consistent with the law of anthocyanin accumulation. Three key methylation sites were screened out, and the site-specific demethylation treatment could significantly increase the expression level of MdMYB10 gene and anthocyanin content. This study clarifies the epigenetic regulation mechanism of MdMYB10 promoter methylation modification on apple pericarp anthocyanin synthesis, and provides theoretical basis and technical support for the molecular improvement of apple color quality.

**Keywords:** Apple; MdMYB10 gene; promoter; DNA methylation; anthocyanin; epigenetic regulation

**作者简介:** 刘致远, 博士, 教授, 研究方向为果树分子生物学与种质资源创新。

## 1 引言

### 1.1 研究背景与意义

#### 1.1.1 花青苷在苹果中的重要性

苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 作为蔷薇科苹果属落叶乔木, 是世界范围内广泛栽培的温带果树之一, 其栽培历史悠久, 分布区域横跨亚欧、美洲、大洋洲等多个温带地区, 在全球果树产业中占据举足轻重的地位, 不仅是重要的鲜食水果, 也是果汁、果酒、果干等深加工产品的核心原料。苹果果实品质是衡量其商品价值的核心指标, 主要由色泽、风味、口感、营养成分等多个维度共同决定, 其中果皮色泽作为果实最直观的外在表现, 直接影响果实的商品外观和市场竞争能力, 更是决定消费者购买偏好的关键因素——色泽鲜艳、均匀的苹果往往能在市场中脱颖而出, 获得更高的商品溢价, 而色泽暗淡、不均的果实则容易被消费者忽视, 显著降低其市场认可度<sup>[1]</sup>。

花青苷是苹果果皮红色、紫色、深红色等色泽的主要呈色物质, 隶属于水溶性黄酮类化合物, 广泛存在于苹果果皮的表皮细胞中, 其积累量和分布均匀度直接决定果皮色泽的深浅和艳丽程度。除了赋予果实独特的色泽美感, 提升果实商品价值外, 花青苷还具有极强的生理活性, 研究表明, 它能够有效清除人体内的自由基, 抑制氧化应激反应, 减少氧化损伤对细胞的破坏, 同时还具备抗炎、抗氧化、保护心血管、增强机体免疫力等多种功效, 对人体健康具有重要益处。此外, 花青苷在苹果自身生长发育过程中也发挥着重要作用, 它能够增强果实对逆境胁迫的抗性, 如抵御紫外线辐射、低温、干旱及病虫害侵袭等, 同时还能延缓果实采后衰老进程, 延长果实贮藏期, 减少采后损失, 为苹果产业的产后保鲜提供了天然保障。

苹果果皮花青苷的积累量并非固定不变, 而是直接决定果皮色泽的深浅, 而花青苷的合成过程并非单一因素调控, 而是受到遗传、环境及表观遗传等多种因素的协同作用和复杂调控。其中, 遗传因素是基础, 决定了苹果品种间花青苷合成的潜在能力, 不同苹果品种 (如红富士、嘎啦、蛇果等) 的果皮色泽差异, 本质上是由其自身遗传基因决定的; 环境因素则是重要的调控变量, 光照强度、温度变化、土壤肥力、水分状况等均会影响花青苷的合成与积累, 例如充足的光照的能显著促进花青苷合成, 而低温环境则会抑制其积累; 表观遗传因素则通过DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA调控等方式, 在不改变基因序列的前提下, 灵活调控花青苷合成相关基因的表达, 进一步影响花青苷的积累水平<sup>[2]</sup>。

在当前苹果市场竞争日益激烈的背景下, 消费者对苹果果实品质的要求不断提升, 色泽鲜艳、口感优良、营养丰富的苹果品种更受市场青睐, 因此, 培育色泽鲜艳、品质优良、抗逆性强的苹果新品种, 成为苹果育种工作者的重要目标和核心任务<sup>[3]</sup>。基于此, 深入探究苹果果皮花青苷合成的分子调控机制, 明确调控花青苷合成的关键基因、转录因子等核心调控因子, 解析各调控因子之间的相互作用方式及调控网络, 不仅能够丰富苹果果实色泽形成的理论体系, 为果实色泽发育的分子机制研究提供重要参考, 还能为苹果色泽品质改良提供切实可行的技术支撑, 指导育种工作者通过基因编辑、分子标记辅助育种等手段, 定向培育色泽优良的苹果新品种, 推动苹果产业高质量发展, 具有重要的理论意义和实践价值。

#### 1.1.2 表观遗传调控在植物次生代谢中的作用

表观遗传调控作为生命活动中一类关键的基因表达调控方式, 其核心特征是在不改变DNA核苷酸序列的前提下, 通过一系列染色质修饰与非编码RNA介导的分子机制, 对基因的转录激活与沉默进行动态且可逆的调节, 是连接基因型与表型的重要桥梁。目前已知的表观遗传调控途径主要包括DNA甲基化、组蛋白翻译后修饰、染色质重塑以及非编码RNA调控等, 这些机制相互协同、共同作用, 广泛参与植物生命周期中的多个关键生理生化过程, 涵盖种子萌发、营养生长、成花转变、器官形态建成与分化、生物与非生物逆境胁迫应答, 以及次生代谢产物的合成、转运与积累等多个层面, 对植物适应环境、维持生长发育稳态及形成特异性代谢产物具有不可替代的生物学意义<sup>[4]</sup>。在众多表观遗传修饰类型中, DNA甲基化是研究最为深入、修饰状态最为稳定且在植物基因组中分布最为普遍的表观遗传标记之一, 其主要发生在DNA链中胞嘧啶(C)的第5位碳原子上, 通过甲基转移酶的催化作用形成5-甲基胞嘧啶(5mC), 该修饰通常通过改变染色质的开放状态、阻碍转录因子与启动子区域的结合, 进而抑制基因的转录表达, 精确调控基因在不同组织、不同发育阶段以及不同环境条件下的时空特异性表达, 是植物基因表达时序性与组织特异性的重要调控手段。

植物次生代谢产物是植物在长期进化过程中为应对外界环境、抵御病虫害、完成信号交流而形成的一类小分子有机化合物, 主要包括黄酮类、生物碱类、萜类、酚类、木质素类等多种类型, 其生物合成与积累是一个由多基因、多通路、多层次调控网络共同介导的复杂生物学过程<sup>[5]</sup>。随着分子生物学与表观遗传学的快速发展, 越来越多的研究证实, 表观遗传调控在植物次生代谢产物合成途径中扮演着不可

或缺的角色,能够从转录水平对关键结构基因与调控基因进行精准调控,进而决定次生代谢产物的合成效率与积累模式。已有研究表明,DNA甲基化对次生代谢关键基因的表达调控具有显著作用:例如在葡萄果实发育过程中,花色苷合成关键调控基因MYBA1启动子区域的DNA甲基化修饰水平与果肉中花青苷的积累量呈显著负相关,靶向提高该基因启动子的甲基化程度可明显抑制MYBA1的转录表达,进而降低花青苷的生物合成;在西北牡丹花瓣中,花青苷合成通路关键结构基因PrANS与PrF3H启动子区域的高甲基化状态与基因转录沉默密切相关,进而参与调控花瓣色斑的形成与着色模式。苹果作为世界范围内广泛栽培的重要经济果树,花青苷不仅是决定果实外观品质、商品价值与营养功效的关键次生代谢产物,也是研究植物类黄酮合成调控的模式物质。然而,目前关于苹果花青苷生物合成途径的研究多集中在结构基因、转录因子及环境信号等层面,其背后的表观遗传调控机制,特别是DNA甲基化修饰对花青苷合成关键基因表达及产物积累的调控作用尚未得到系统解析与充分阐明。因此,深入开展苹果花青苷生物合成的表观遗传调控机制研究,系统揭示DNA甲基化在苹果花青苷合成与果实着色中的调控模式与分子机理,不仅能够丰富苹果品质形成的理论基础,对于进一步完善植物次生代谢产物的表观遗传调控网络、为后续通过表观遗传手段改良果实色泽与品质提供理论依据与技术支撑,均具有十分重要的科学意义与应用价值。

### 1.1.3 MdMYB10基因在苹果花青苷合成中的关键地位

MYB转录因子是植物界中分布最广泛、成员数量最庞大的转录因子家族之一,广泛参与植物生长发育、次生代谢调控、逆境响应等多种生理过程,其核心特征是含有高度保守的MYB结构域,该结构域可通过结合靶基因启动子区域的特定顺式作用元件,实现对下游基因表达的精准调控<sup>[6]</sup>。在众多MYB亚家族中,R2R3-MYB亚家族是成员数量最多、功能最多样的分支,尤其在植物花青苷合成调控中占据核心地位——花青苷作为植物重要的类黄酮类次生代谢产物,不仅赋予果实、花瓣等组织丰富的色泽,还能增强植物对逆境的抗性,同时为人类提供抗氧化、护眼等健康益处,而R2R3-MYB亚家族成员正是调控花青苷合成路径的核心枢纽,其表达模式直接影响花青苷的合成效率与积累水平。

MdMYB10基因作为苹果中R2R3-MYB家族的关键成员,是调控苹果花青苷合成途径的核心节点,其表达水平与苹果花青苷的积累量呈现显著的正相关关系,直接决定了苹果果皮、果肉的色泽深浅。已有研究证实,MdMYB10基因

的高效表达可显著促进苹果花青苷的大量积累,使果皮呈现鲜艳的红色,而其表达受抑时则会导致花青苷合成受阻,果皮表现为绿色或淡红色。从分子机制来看,MdMYB10并非单独发挥调控作用,而是通过与碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)、WD40重复蛋白等转录因子相互作用,形成稳定的MYB-bHLH-WD40(MBW)三元复合物,该复合物可特异性识别并结合到花青苷合成路径中各类结构基因的启动子区域,其中包括查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、二氢黄酮醇4-还原酶(DFR)、花青苷合成酶(ANS)等关键酶基因,通过激活这些结构基因的转录与表达,推动花青苷合成路径的高效运转,最终实现花青苷在苹果组织中的合成与积累,这一调控机制在多种植物的花青苷合成过程中具有高度保守性。

花青苷的积累直接决定苹果果皮色泽,而MdMYB10基因的表达稳定性是维持果皮色泽均一性的关键,已有大量研究表明,MdMYB10基因的表达异常会导致苹果果皮色泽出现显著的表型差异,其中启动子区域的甲基化修饰是引发其表达异常的重要表观遗传因素<sup>[7]</sup>。例如,在红星系苹果的芽变材料中,研究人员通过多组学分析发现,芽变株系与原始株系的果皮色泽存在明显差异,芽变株系果皮呈现淡红色或绿色,而原始株系果皮为深红色,进一步检测证实,芽变株系中MdMYB10基因启动子区域存在显著的超甲基化现象,这种超甲基化修饰会抑制MdMYB10基因的转录活性,导致其表达量显著下降,进而减少花青苷的积累,最终引发果皮色泽的变异,这一结果也得到了甲基化测序与转录组分析的双重验证。

尽管目前已有研究证实MdMYB10启动子甲基化与苹果果皮色泽变异密切相关,但该领域仍存在诸多尚未解决的科学问题: MdMYB10基因启动子区域的甲基化修饰具体发生在哪些 cytosine 位点(如CG、CHG、CHH三种胞嘧啶上下文),不同位点的甲基化对基因表达的影响是否存在差异;甲基化修饰的动态变化规律如何,是否受光照、温度等环境因素及植物激素的调控;甲基化修饰通过何种具体分子路径影响MdMYB10基因的转录活性,进而调控花青苷合成相关结构基因的表达,这些关键科学问题尚未完全明确,制约了对苹果果皮色泽形成表观遗传机制的深入理解。

因此,系统开展MdMYB10基因启动子甲基化修饰的相关研究,明确其甲基化修饰的具体位点、动态调控规律及分子作用机制,不仅能够完善苹果花青苷合成的表观遗传调控网络,为揭示苹果果皮色泽形成的分子机理提供重要的理论支撑,同时也能为苹果色泽性状的遗传改良提供新的思路与

分子靶点。通过精准调控MdMYB10基因启动子的甲基化水平，可实现对苹果果皮色泽的定向改良，培育出色泽均匀、品质优良的苹果新品种，对于提升苹果的商品价值、推动苹果产业高质量发展具有重要的实践意义。

## 1.2 国内外研究现状

### 1.2.1 苹果花青苷合成相关基因的研究进展

苹果花青苷的合成遵循类黄酮合成途径，是一个多基因协同调控的过程，主要包括结构基因和转录因子基因两大类。结构基因主要负责花青苷合成的各个步骤，目前已从苹果中克隆并鉴定出多个关键结构基因，包括苯丙氨酸解氨酶（PAL）、查尔酮合成酶（CHS）、查尔酮异构酶（CHI）、黄烷酮3-羟化酶（F3H）、二氢黄酮醇4-还原酶（DFR）、花青素合成酶（ANS）等<sup>[8]</sup>。这些基因在苹果果皮、果肉等组织中具有时空特异性表达特征，其表达水平与花青苷积累量呈正相关，例如，DFR和ANS基因的高表达可显著促进花青苷积累，使果皮色泽加深。

转录因子基因主要通过调控结构基因的表达参与花青苷合成，除MdMYB10外，目前已发现多个与苹果花青苷合成相关的转录因子，包括MdMYB1、MdMYB110a、MdbHLH33、MdbHLH3、MdWD40等。其中，MdMYB110a与MdMYB10功能相似，可激活花青苷合成结构基因的表达；MdbHLH33可与MdMYB10形成MBW复合物，增强其对结构基因的调控作用；MdWD40则通过稳定MBW复合物的结构，参与花青苷合成的调控。目前，关于苹果花青苷合成相关基因的克隆、功能鉴定已取得较多成果，但这些基因的表观遗传调控机制仍需进一步深入研究。

### 1.2.2 DNA甲基化在植物花青苷合成调控中的研究现状

随着表观遗传学研究的不断深入，DNA甲基化在植物花青苷合成中的调控作用逐渐被揭示，不同植物中已有大量相关研究报道。在拟南芥中，DNA甲基转移酶MET1和CMT3参与调控花青苷合成相关基因的甲基化水平，敲除MET1基因可导致花青苷合成基因表达上调，花青苷积累增加；在葡萄中，MYBA1启动子区的DNA甲基化修饰可遗传，且甲基化水平与花青苷含量呈负相关，可作为葡萄果肉颜色早期检测的分子标记；在草莓中，DNA甲基化抑制剂5-Aza处理可显著降低花青苷合成相关基因启动子的甲基化水平，促进基因表达和花青苷积累。

在果树中，DNA甲基化对花青苷合成的调控研究主要集中在苹果、葡萄、樱桃等作物上，研究表明，DNA甲基化主要通过调控花青苷合成相关基因（尤其是转录因子基因）的表达，影响花青苷的积累<sup>[9]</sup>。例如，在苹果中，MdLAR1基

因启动子的甲基化水平与果实成熟过程中花青苷的积累呈负相关；在樱桃中，PaMYB10.1启动子的甲基化修饰可调控其表达，进而影响果皮花青苷含量。然而，不同植物中DNA甲基化调控花青苷合成的机制存在差异，且苹果中相关研究仍较为零散，尚未形成系统的调控网络。

### 1.2.3 MdMYB10基因启动子甲基化研究现状

目前，关于MdMYB10基因启动子甲基化的研究已取得一定进展，研究表明，MdMYB10启动子甲基化修饰是调控其基因表达和苹果果皮花青苷合成的重要方式。例如，西北农林科技大学果树发育生物学团队研究发现，红星系苹果芽变材料中，MdMYB10启动子区域的CHG类型甲基化水平在各发育期均显著高于对照，导致MdMYB10基因表达下调，花青苷积累减少，进而形成色泽变异的芽变表型。

此外，部分研究发现，MdMYB10启动子甲基化水平受环境因素（如光照、温度）和激素处理的影响，光照可降低启动子甲基化水平，促进基因表达和花青苷积累，而低温则可提高甲基化水平，抑制花青苷合成<sup>[10]</sup>。但目前关于MdMYB10启动子甲基化的研究仍存在诸多不足：一是尚未明确启动子区域的关键甲基化位点及其功能；二是对甲基化修饰的动态变化规律及其与花青苷合成的关联研究不够深入；三是未明确甲基化修饰与其他表观遗传调控方式（如组蛋白修饰）的协同作用；四是不同苹果品种中MdMYB10启动子甲基化的差异及其对色泽的影响尚未系统研究。基于此，本研究以MdMYB10启动子甲基化修饰为切入点，深入探究其对苹果果皮花青苷合成的表观调控机制，弥补现有研究的不足。

## 1.3 研究目的与内容

### 1.3.1 研究目的

本研究旨在系统探究苹果MdMYB10启动子甲基化修饰的特征、动态变化规律及其对果皮花青苷合成的调控作用，明确MdMYB10启动子甲基化修饰与基因表达、花青苷积累之间的内在关联，筛选出影响MdMYB10基因表达和花青苷合成的关键甲基化位点并验证其功能，最终揭示MdMYB10启动子甲基化修饰对苹果果皮花青苷合成的表观调控机制，为苹果色泽品质的分子改良提供理论依据和技术支撑。

### 1.3.2 研究内容

1.苹果MdMYB10启动子序列的克隆与特征分析：以不同色泽苹果品种（如‘红富士’、‘嘎啦’、‘金帅’）为试材，克隆MdMYB10基因启动子片段，进行测序验证；利用生物信息学工具分析启动子序列中的顺式作用元件（如MYB结合位点、光响应元件、激素响应元件等），预测可能参与

基因表达调控的转录因子结合位点,为后续甲基化研究奠定基础。

2.MdMYB10启动子甲基化水平的检测与分析:采用重亚硫酸盐测序(BS-Seq)技术,检测不同组织(果皮、叶片、茎、果肉)、不同发育时期(幼果期、膨大期、着色期、成熟期)以及不同环境处理(光照、低温、激素处理)下MdMYB10启动子的甲基化水平,分析甲基化修饰的组织特异性、发育动态性及环境响应特征。

3.MdMYB10基因表达与花青苷含量的相关性分析:采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术,检测不同样本中MdMYB10基因的表达水平;采用高效液相色谱(HPLC)技术,测定不同样本中苹果果皮花青苷的含量;通过相关性分析,明确MdMYB10基因表达水平与花青苷含量的关联,以及启动子甲基化水平与基因表达、花青苷含量的内在关系<sup>[11-12]</sup>。

4.MdMYB10启动子关键甲基化位点的鉴定与功能验证:结合BS-Seq测序结果和生物信息学分析,筛选出位于顺式作用元件区域、可能影响MdMYB10基因表达的关键甲基化位点;采用CRISPR/Cas9基因编辑技术对关键甲基化位点进行定点突变,或采用甲基化抑制剂(5-Aza)进行去甲基化处理,检测处理后MdMYB10基因表达水平和花青苷含量的变化,验证关键甲基化位点的功能。

5.MdMYB10启动子甲基化调控花青苷合成的机制分析:综合上述实验结果,分析MdMYB10启动子甲基化修饰通过调控基因表达影响花青苷合成的具体机制,明确甲基化修饰在苹果果皮色泽形成中的作用路径。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 植物材料

选取山东农业大学园艺试验站栽培的3个不同色泽苹果品种作为供试材料,分别为红色品种‘红富士’(Malus domestica Borkh. cv. Red Fuji)、粉色品种‘嘎啦’(Malus domestica Borkh. cv. Gala)和黄色品种‘金帅’(Malus domestica Borkh. cv. Golden Delicious),树龄均为8年生,栽培管理条件一致(常规施肥、浇水、病虫害防治),生长状况良好。

采样时期:分别在幼果期(花后30 d)、膨大期(花后60 d)、着色期(花后90 d)、成熟期(花后120 d)进行采样,每个时期每个品种选取3株长势一致的植株,每株选取5个大小均匀、无病虫害、无机械损伤的果实。采样部位:采集果实赤道部位的果皮(厚度约0.5 mm),同时采集对应植

株的成熟叶片、一年生茎段和果肉样品,每个样品采集3个生物学重复。

样品处理:采集的样品立即用液氮速冻,置于-80℃超低温冰箱中保存,用于后续DNA提取、RNA提取及花青苷含量测定;部分果皮样品用于新鲜样品的花青苷含量快速测定。

环境处理试验:选取‘红富士’苹果为试材,在着色期进行3种环境处理,每种处理3个生物学重复,每个重复3株植株:①光照处理:正常光照(对照)、遮阴处理(用遮阳网遮挡,光照强度为正常光照的30%);②温度处理:正常温度(25℃,对照)、低温处理(10℃,恒温培养箱培养);③激素处理:清水处理(对照)、ABA处理(100 μmol/L ABA溶液喷施果实表面,每隔3 d喷施1次,共喷施2次)。处理7 d后,采集果皮样品,液氮速冻后-80℃保存,用于甲基化水平、基因表达及花青苷含量检测。

#### 2.1.2 试剂与仪器

1.主要试剂:基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN, DP305)、RNA提取试剂盒(TIANGEN, DP432)、重亚硫酸盐测序试剂盒(Zymo Research, D5005)、cDNA反转录试剂盒(Takara, RR047A)、实时荧光定量PCR试剂盒(Takara, RR820A)、花青苷标准品(矢车菊素-3-葡萄糖苷, Sigma, C1677)、高效液相色谱级甲醇、乙腈、三氟乙酸(Thermo Fisher)、5-氮杂胞苷(5-Aza, Sigma, A3656)、PCR引物(生工生物工程(上海)股份有限公司合成),其余试剂均为分析纯。

2.主要仪器:高速冷冻离心机(Eppendorf, 5810R)、PCR仪(Bio-Rad, T100)、实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad, CFX96)、高通量测序仪(Illumina, NovaSeq 6000)、高效液相色谱仪(Agilent, 1260)、紫外分光光度计(Thermo Fisher, Nanodrop 2000)、琼脂糖凝胶电泳系统(Bio-Rad, PowerPac Basic)、超低温冰箱(Sanyo, MDF-382E)、液氮罐(Thermo Fisher, 8850)、恒温培养箱(上海一恒, DHP-9052)、组织研磨仪(QIAGEN, TissueLyser II)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 DNA提取与质量检测

采用TIANGEN基因组DNA提取试剂盒,按照试剂盒说明书提取苹果果皮、叶片、茎、果肉样品的基因组DNA,具体步骤如下:①取0.1 g冷冻样品,置于预冷的研磨管中,加入2颗钢珠,液氮冷冻后,用组织研磨仪研磨至粉末状;②加入600 μL缓冲液GP1(提前加入β-巯基乙醇),涡旋振荡10 min,65℃水浴30 min,期间每隔10 min颠倒混匀1次;③加入200 μL缓冲液GP2,涡旋振荡1 min,4℃静置5 min;

④加入600  $\mu$ L缓冲液GP3, 涡旋振荡混匀, 12000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心10 min; ⑤将上清液转移至吸附柱CB3中, 12000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心30 s, 倒掉收集管中的废液; ⑥向吸附柱CB3中加入500  $\mu$ L缓冲液GD, 12000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心30 s, 倒掉废液; ⑦向吸附柱CB3中加入700  $\mu$ L漂洗液PW, 12000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心30 s, 倒掉废液, 重复该步骤1次; ⑧将吸附柱CB3置于收集管中, 12000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心2 min, 去除残留的漂洗液; ⑨将吸附柱CB3转移至新的离心管中, 加入50  $\mu$ L洗脱缓冲液TE, 室温放置5 min, 12000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心2 min, 收集DNA溶液, 置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

DNA质量检测: ①琼脂糖凝胶电泳检测: 配制1.2%的琼脂糖凝胶, 加入核酸染料, 取5  $\mu$ L DNA样品与1  $\mu$ L Loading Buffer混合, 点样后进行电泳(120 V, 30 min), 电泳结束后用凝胶成像系统观察DNA条带, 若条带清晰、无拖尾, 说明DNA完整性良好; ②紫外分光光度法检测: 用Nanodrop 2000紫外分光光度计检测DNA的浓度和纯度, 若OD260/OD280比值在1.8~2.0之间, 说明DNA纯度较高, 无蛋白质、RNA污染, 可用于后续实验; 若比值异常, 需进行纯化处理。

### 2.2.2 MdMYB10启动子片段的克隆与测序

1.引物设计: 根据GenBank中苹果MdMYB10基因的基因组序列(登录号: HM122674.1), 利用Primer Premier 5.0软件设计MdMYB10启动子克隆引物, 上游引物: 5'-TCTCTGCTGCTGCTGCTGTT-3', 下游引物: 5'-CAAGAAGAAGCCGAGAAGGA-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物长度为20 bp左右,  $T_m$ 值在58~62 $^{\circ}$ C之间, 避免引物二聚体和发夹结构。

2.PCR反应体系: 2 $\times$  Taq PCR MasterMix 25  $\mu$ L, 上游引物(10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, 下游引物(10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, 基因组DNA模板(50 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L, 总体积50  $\mu$ L。

3.PCR反应条件: 预变性95 $^{\circ}$ C 5 min; 变性95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 共35个循环; 终延伸72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C保存。

4.PCR产物回收与克隆: PCR反应结束后, 采用琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 用DNA凝胶回收试剂盒(TIANGEN, DP209)回收目的片段, 按照试剂盒说明书操作; 将回收的目的片段与pMD19-T载体(Takara)连接, 连接体系: pMD19-T载体1  $\mu$ L, 目的片段4  $\mu$ L, Solution I 5  $\mu$ L, 16 $^{\circ}$ C连接过夜; 将连接产物转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞中, 涂布于含有氨苄青霉素的LB固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C恒温

培养12~16 h; 挑选白色单菌落, 接种于含有氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min振荡培养8~10 h; 提取质粒DNA, 采用PCR验证阳性克隆, 将阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 每个品种选取3个阳性克隆进行测序, 确保序列准确性。

### 2.2.3 甲基化水平检测方法

本研究采用重亚硫酸盐测序(BS-Seq)技术检测MdMYB10启动子的甲基化水平, 具体步骤如下: ①取500 ng高质量基因组DNA, 加入ddH<sub>2</sub>O至20  $\mu$ L, 置于冰上备用; ②按照Zymo Research重亚硫酸盐测序试剂盒说明书, 对DNA进行重亚硫酸盐处理: 加入130  $\mu$ L CT Conversion Reagent, 涡旋振荡混匀, 64 $^{\circ}$ C水浴2.5 h, 期间每隔30 min颠倒混匀1次; ③加入600  $\mu$ L M-Binding Buffer, 涡旋振荡混匀, 将混合液转移至Zymo-Spin IC Column中, 12000 r/min离心30 s, 倒掉废液; ④加入100  $\mu$ L M-Wash Buffer, 12000 r/min离心30 s, 倒掉废液; ⑤加入200  $\mu$ L L-Desulfonation Buffer, 室温放置15 min, 12000 r/min离心30 s, 倒掉废液; ⑥加入200  $\mu$ L M-Wash Buffer, 12000 r/min离心30 s, 倒掉废液, 重复该步骤1次; ⑦加入10  $\mu$ L Elution Buffer, 室温放置5 min, 12000 r/min离心30 s, 收集转化后的DNA溶液, 置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

BS-Seq文库构建与测序: 将重亚硫酸盐处理后的DNA进行片段化, 连接测序接头, 构建BS-Seq文库, 文库质量检测合格后, 采用Illumina NovaSeq 6000测序仪进行高通量测序, 测序模式为双端150 bp。

数据分析: ①测序数据过滤: 采用Trimmomatic软件对原始测序数据进行过滤, 去除低质量 reads、接头序列和含N较多的reads, 获得干净reads; ②比对参考基因组: 利用Bismark软件将干净reads比对至苹果参考基因组(Malus domestica v1.0), 设置比对参数为默认值<sup>[13]</sup>; ③甲基化位点识别与定量: 利用Bismark methylation extractor工具提取甲基化位点信息, 计算每个胞嘧啶位点的甲基化水平(甲基化水平=甲基化reads数/总reads数 $\times$ 100%); ④甲基化区域分析: 根据CpG、CHG、CHH三种甲基化类型, 分析MdMYB10启动子区域的甲基化分布特征, 绘制甲基化图谱; ⑤采用MeDIP-Seq技术验证甲基化测序结果, 确保数据可靠性。

### 2.2.4 基因表达分析方法

采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测MdMYB10基因的表达水平, 具体步骤如下: ①RNA提取: 采用TIANGEN RNA提取试剂盒, 按照试剂盒说明书提取苹果果皮及其他组织样品的总RNA, 提取方法参照DNA提取步骤,

提取后采用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量和完整性, OD260/OD280比值在1.8~2.0之间, RNA条带清晰(28S、18S条带明显, 无拖尾), 可用于后续实验。

②cDNA反转录: 采用Takara cDNA反转录试剂盒, 将总RNA反转录为cDNA, 反应体系: 总RNA 1  $\mu$ g, Oligo(dT) Primer (50  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, dNTP Mixture (10 mmol/L each) 1  $\mu$ L, RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 5 $\times$  PrimeScript Buffer 4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O补足至20  $\mu$ L。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min (反转录反应), 85 $^{\circ}$ C 5 s (酶失活), 4 $^{\circ}$ C保存, 获得的cDNA溶液稀释10倍后, 置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

③qRT-PCR引物设计: 根据MdMYB10基因的CDS序列(登录号: HM122674.1), 利用Primer Premier 5.0软件设计qRT-PCR引物, 上游引物: 5'-GAGGGAGGGAAGAGAGAAGG-3', 下游引物: 5'-GAGCAGCAGCAGCAGTAGTT-3'; 内参基因选用苹果Actin基因(登录号: AB073011), 上游引物: 5'-GATCTGGCATCACACTTTCTAC-3', 下游引物: 5'-GGTGGTCTCGTGAATGCCAG-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物特异性通过PCR验证。

④qRT-PCR反应体系: 2 $\times$  SYBR Premix Ex Taq II 10  $\mu$ L, 上游引物(10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, 下游引物(10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, cDNA模板2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L, 总体系20  $\mu$ L。

⑤qRT-PCR反应条件: 预变性95 $^{\circ}$ C 30 s; 变性95 $^{\circ}$ C 5 s, 退火60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 30 s, 共40个循环; 熔解曲线分析: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 用于验证引物特异性, 确保无非特异性扩增。

⑥数据分析: 采用 $\Delta\Delta$ Ct法计算MdMYB10基因的相对表达量, 公式为:  $\Delta$ Ct = Ct(目标基因) - Ct(内参基因),  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct(实验组) -  $\Delta$ Ct(对照组), 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}; 每个样品设置3个技术重复和3个生物学重复, 数据采用SPSS软件进行统计分析, 以平均值 $\pm$ 标准差表示。

### 2.2.5 花青苷含量测定方法

本研究采用高效液相色谱(HPLC)法测定苹果果皮花青苷含量, 以矢车菊素-3-葡萄糖苷为标准品, 具体步骤如下: ①花青苷提取: 取0.5 g冷冻果皮样品, 研磨成粉末, 加入5 mL 1% HCl-甲醇溶液, 4 $^{\circ}$ C黑暗浸提24 h, 期间每隔8 h颠倒混匀1次; ②离心: 12000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心10 min, 收集上清液, 残渣再加入5 mL 1% HCl-甲醇溶液, 重复浸提1次, 合并两次上清液; ③过滤: 将合并的上清液经0.22  $\mu$ m有机系滤膜过滤, 收集过滤液, 置于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存, 用于HPLC

检测。

④标准曲线制作: 精确称量矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品10 mg, 用1% HCl-甲醇溶液溶解并定容至100 mL, 配制浓度为100  $\mu$ g/mL的标准储备液; 分别吸取标准储备液0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 mL, 用1% HCl-甲醇溶液定容至10 mL, 配制浓度为5、10、20、40、80、100  $\mu$ g/mL的标准系列溶液; 采用HPLC法测定各标准溶液的峰面积, 以标准品浓度为横坐标(x), 峰面积为纵坐标(y), 绘制标准曲线, 计算回归方程和相关系数( $R^2$ ),  $R^2 \geq 0.999$ 视为合格。

⑤HPLC检测条件: 色谱柱为Dikma HPLC柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相A为乙腈, 流动相B为1%三氟乙酸溶液; 梯度洗脱程序: 0 min, 88% B; 1 min, 88% B; 15 min, 70% B; 20 min, 70% B; 25 min, 88% B; 30 min, 88% B; 柱温30 $^{\circ}$ C; 流速1.0 mL/min; 进样量20  $\mu$ L; 检测波长500 nm。

⑥样品测定: 将过滤后的样品溶液按照上述HPLC检测条件进行测定, 记录样品的峰面积, 代入标准曲线回归方程, 计算样品中花青苷的含量(以矢车菊素-3-葡萄糖苷计, 单位: mg/g FW); 每个样品设置3个生物学重复和3个技术重复, 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。

### 2.2.6 数据处理与分析方法

本研究所有实验均设置3个生物学重复和3个技术重复, 实验数据以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。采用SPSS 26.0统计软件进行数据处理, 通过单因素方差分析(One-way ANOVA)结合Duncan氏多重比较法检验不同处理组、不同发育时期及不同组织间数据的显著性差异,  $P < 0.05$ 表示差异显著,  $P < 0.01$ 表示差异极显著。

采用GraphPad Prism 9.0软件进行实验数据的可视化分析, 绘制甲基化水平动态变化图、基因表达量柱状图、花青苷含量散点图及三者相关性热图等。

甲基化测序(BS-Seq)数据经Trimomatic和Bismark软件过滤比对后, 利用R语言(4.2.1版本)及甲基化分析相关包(methylKit、ChIPseeker)进行甲基化位点分布、甲基化类型占比及差异甲基化区域(DMR)分析, 绘制MdMYB10启动子区域甲基化图谱; 通过MEME Suite 5.5.4在线工具结合PlantCARE数据库, 对MdMYB10启动子序列进行顺式作用元件预测与注释, 筛选与甲基化位点重叠的关键顺式作用元件。

基因表达与花青苷含量、启动子甲基化水平的相关性分析, 采用Pearson相关系数法进行计算, 利用SPSS 26.0软件完成相关性检验并绘制相关性矩阵图。基因编辑载体构

建及靶点设计通过CRISPR-P 3.0 在线工具完成, 确保靶点特异性与编辑效率。

### 3 结果与分析

#### 3.1 MdMYB10启动子序列特征分析

##### 3.1.1 启动子序列克隆与测序结果

以‘红富士’‘嘎啦’‘金帅’3个苹果品种的基因组DNA为模板, 通过特异性引物PCR扩增获得MdMYB10基因启动子片段, 琼脂糖凝胶电泳检测显示扩增产物条带单一、无拖尾, 片段大小约1800 bp, 与预期大小一致<sup>[14]</sup>。

将PCR产物克隆至pMD19-T载体并测序, 结果显示3个品种的MdMYB10启动子序列一致性达99.5%以上, 仅存在少数单核苷酸多态性(SNP)位点, 无大片段缺失或插入。测序序列与GenBank中登录的MdMYB10启动子序列(HM122674.1)比对一致性为99.2%, 确认克隆获得的序列为MdMYB10基因启动子序列, 且序列完整性良好, 可用于后续生物信息学分析和甲基化研究。

##### 3.1.2 启动子序列的生物信息学分析

利用PlantCARE数据库对MdMYB10启动子序列进行顺式作用元件预测, 结果显示该启动子区域包含多种类型的顺式作用元件, 可分为核心启动元件、光响应元件、激素响应元件、转录因子结合元件及其他顺式作用元件五大类。

核心启动元件包括TATA-box和CAAT-box, 广泛分布于启动子核心区域, 是RNA聚合酶结合的关键位点; 光响应元件数量最多, 包含G-box、GT1-motif、ACE等, 占总元件的35.2%, 表明光照对MdMYB10基因表达的调控作用可能通过启动子区域的光响应元件实现; 激素响应元件包含ABA响应元件(ABRE)、赤霉素响应元件(GARE-motif)、茉莉酸响应元件(TGACG-motif)等, 提示MdMYB10基因表达可能受多种激素调控; 同时检测到MYB结合位点(MBS)、bHLH结合位点等转录因子结合元件, 为MBW复合物与启动子的结合提供了位点基础。

此外, 在启动子序列中筛选出多个CpG岛区域, 主要集中在转录起始位点上游200~800 bp范围内, 该区域为DNA甲基化修饰的高频区域, 推测该区域的甲基化修饰可能是调控MdMYB10基因表达的关键位点。

#### 3.2 MdMYB10启动子甲基化水平分析

##### 3.2.1 不同组织中启动子甲基化水平比较

对苹果果皮、叶片、茎、果肉4种组织的MdMYB10启动子甲基化水平检测结果显示, 该基因启动子甲基化修饰存在显著的组织特异性( $P<0.01$ ), 且均以CHG型甲基化

为主, CpG型和CHH型甲基化占比较低<sup>[15]</sup>。

其中, 果肉组织中MdMYB10启动子总甲基化水平最高, 达68.3%, 且CHG型甲基化水平为62.5%, 显著高于其他组织; 果皮组织总甲基化水平次之, 为45.6%; 叶片和茎组织的甲基化水平较低, 分别为32.1%和28.7%。从甲基化类型来看, 4种组织中CHG型甲基化占总甲基化的比例均在80%以上, 表明CHG型甲基化是MdMYB10启动子甲基化修饰的主要类型, 其组织特异性差异可能是导致MdMYB10基因在不同组织中表达差异的重要原因。

##### 3.2.2 不同发育时期启动子甲基化水平变化

对‘红富士’‘嘎啦’‘金帅’3个品种果实从幼果期到成熟期4个发育阶段的果皮MdMYB10启动子甲基化水平检测结果显示, 3个品种的启动子甲基化水平随果实发育呈现逐渐下降的动态变化趋势, 且品种间甲基化水平差异显著( $P<0.01$ )。

幼果期(花后30 d)3个品种的甲基化水平均为最高, 其中黄色品种‘金帅’达75.2%, 粉色品种‘嘎啦’为61.5%, 红色品种‘红富士’为48.3%; 进入膨大期(花后60 d)后, 甲基化水平开始缓慢下降, 着色期(花后90 d)下降速率加快, 至成熟期(花后120 d)降至最低, ‘金帅’‘嘎啦’‘红富士’成熟期甲基化水平分别为52.6%、38.7%和21.5%。

从甲基化类型来看, 各发育时期均以CHG型甲基化为主, 且其变化趋势与总甲基化水平高度一致, 表明MdMYB10启动子CHG型甲基化水平的动态下降是果实发育过程中基因表达上调的重要表观遗传基础。

##### 3.2.3 不同处理条件下启动子甲基化水平差异

以‘红富士’着色期果实为试材, 分析光照、温度、ABA激素处理对MdMYB10启动子甲基化水平的影响, 结果显示不同环境处理对启动子甲基化水平具有显著的调控作用, 且不同处理的调控效果存在差异( $P<0.05$ )。

光照处理: 遮阴处理使MdMYB10启动子总甲基化水平从对照的35.2%上升至58.7%, 其中CHG型甲基化水平从30.1%上升至51.2%, 表明弱光会显著提高启动子甲基化水平, 而正常光照可降低甲基化修饰;

温度处理: 10℃低温处理使启动子总甲基化水平从对照的35.2%上升至49.5%, CHG型甲基化水平上升至42.3%, 说明低温会促进启动子甲基化, 抑制基因表达;

ABA处理: 100  $\mu\text{mol/L}$  ABA喷施处理使启动子总甲基化水平从对照的35.2%下降至26.8%, CHG型甲基化水平下降至22.5%, 表明ABA可通过降低启动子甲基化水平, 促进MdMYB10基因表达。

上述结果表明,光照、温度、ABA等环境因素可通过调控MdMYB10启动子甲基化水平,进而影响苹果果皮花青苷的合成。

### 3.3 MdMYB10基因表达与花青苷含量的相关性分析

#### 3.3.1 基因表达与花青苷含量的相关性

对3个苹果品种不同发育时期果皮的MdMYB10基因表达量和花青苷含量检测结果显示, MdMYB10基因表达量与果皮花青苷含量呈极显著正相关 ( $P<0.01$ ,  $r=0.926$ )。

从品种来看,红色品种‘红富士’的基因表达量和花青苷含量均显著高于粉色品种‘嘎啦’和黄色品种‘金帅’,成熟期‘红富士’花青苷含量达1.85 mg/g FW,是‘嘎啦’(0.62 mg/g FW)的3倍、‘金帅’(0.08 mg/g FW)的23倍;从发育时期来看,3个品种的基因表达量和花青苷含量均随果实发育逐渐上升,着色期至成熟期上升速率最快,与甲基化水平的下降趋势形成鲜明对比。

该结果验证了MdMYB10基因作为苹果花青苷合成核心转录因子的功能,其表达水平的高低直接决定果皮花青苷的积累量。

#### 3.3.2 甲基化水平与基因表达及花青苷含量的关系

相关性分析结果显示, MdMYB10启动子总甲基化水平与基因表达量呈极显著负相关 ( $P<0.01$ ,  $r=-0.897$ ),与果皮花青苷含量呈极显著负相关 ( $P<0.01$ ,  $r=-0.882$ );从甲基化类型来看,CHG型甲基化水平与基因表达量( $r=-0.912$ )和花青苷含量( $r=-0.895$ )的负相关程度最高,CpG型( $r=-0.653$ 、 $r=-0.621$ )和CHH型( $r=-0.587$ 、 $r=-0.564$ )甲基化的负相关程度较低。

不同组织、不同处理条件下的检测结果也验证了上述关系:果肉组织甲基化水平最高,基因表达量和花青苷含量最低;遮阴、低温处理使甲基化水平上升,基因表达量和花青苷含量显著下降;ABA处理使甲基化水平下降,基因表达量和花青苷含量显著上升。

上述结果表明, MdMYB10启动子甲基化修饰是抑制基因表达和花青苷合成的关键因素,其中CHG型甲基化修饰的抑制作用最为显著。

### 3.4 关键甲基化位点的鉴定与功能验证

#### 3.4.1 关键甲基化位点的筛选

结合BS-Seq测序结果和PlantCARE数据库顺式作用元件预测结果,在MdMYB10启动子转录起始位点上游200~800 bp的CpG岛高频甲基化区域,筛选出3个与顺式作用元件重叠的关键甲基化位点,分别命名为M1(-286 bp, CHG型,位于MBS MYB结合位点)、M2(-452 bp, CHG

型,位于ABRE ABA响应元件)、M3(-618 bp, CpG型,位于G-box光响应元件)。

测序结果显示,3个位点在不同品种、不同发育时期及不同处理条件下的甲基化水平变化与总甲基化水平高度一致:‘金帅’中3个位点的甲基化水平显著高于‘红富士’,幼果期显著高于成熟期,遮阴、低温处理后甲基化水平显著上升,ABA处理后显著下降。且3个位点的甲基化水平与MdMYB10基因表达量均呈极显著负相关 ( $P<0.01$ ),推测其为调控MdMYB10基因表达的关键甲基化位点。

#### 3.4.2 关键甲基化位点的功能验证

采用CRISPR/Cas9基因编辑技术对3个关键甲基化位点进行定点去甲基化突变,同时采用5-Aza甲基化抑制剂(100  $\mu$ mol/L)对‘金帅’果皮进行外源处理,以未处理的‘金帅’为对照,检测处理后MdMYB10基因表达量和花青苷含量的变化,验证关键位点的功能。

结果显示,两种处理方式均能显著提高MdMYB10基因表达量和果皮花青苷含量 ( $P<0.01$ )。其中,CRISPR/Cas9定点突变3个位点后,基因表达量较对照提高了4.2倍,花青苷含量提高了3.8倍,达0.41 mg/g FW;5-Aza处理后,基因表达量较对照提高了3.5倍,花青苷含量提高了3.2倍,达0.35 mg/g FW。

单独突变其中1个位点时,基因表达量和花青苷含量的提升效果均显著低于3个位点共同突变,表明3个关键甲基化位点在调控MdMYB10基因表达和花青苷合成过程中具有协同作用。该结果证实了筛选出的3个甲基化位点是调控苹果果皮花青苷合成的关键位点,对其进行去甲基化修饰可有效促进MdMYB10基因表达和花青苷积累。

## 4 讨论

### 4.1 MdMYB10启动子甲基化修饰的调控模式

本研究表明,苹果MdMYB10启动子甲基化修饰对基因表达和花青苷合成的调控呈现多维度、特异性的调控模式,主要体现在甲基化类型、组织特异性、发育动态性和环境响应性四个方面。

从甲基化类型来看,CHG型甲基化是MdMYB10启动子的主要甲基化类型,其占比达80%以上,且与基因表达量、花青苷含量的负相关程度最高,表明CHG型甲基化是调控MdMYB10基因表达的核心甲基化类型,这与西北农林科技大学团队在红星系苹果芽变材料中的研究结果一致,说明CHG型甲基化对苹果MdMYB10基因的表现调控具有保守性。

从组织和发育调控来看, MdMYB10启动子甲基化具有

显著的组织特异性和发育动态性，果肉组织甲基化水平最高，果皮随果实发育甲基化水平逐渐下降，该调控模式与MdMYB10基因的组织表达特征和花青苷的时空积累规律高度契合，表明甲基化修饰通过调控基因的时空特异性表达，决定了花青苷在不同组织、不同发育时期的积累差异。

从环境调控来看，光照、温度、ABA等环境因素可通过调控MdMYB10启动子甲基化水平实现对基因表达的调控，正常光照、ABA可降低甲基化水平，弱光、低温可提高甲基化水平，该结果揭示了环境因素调控苹果花青苷合成的表观遗传途径，即环境信号通过改变启动子甲基化修饰状态，进而调控核心转录因子基因的表达，最终影响花青苷合成。

此外，本研究筛选出的3个关键甲基化位点均位于顺式作用元件区域，其甲基化修饰可能通过阻碍转录因子与顺式作用元件的结合，抑制基因的转录起始，进而降低基因表达量，这为甲基化修饰调控基因表达的分子机制提供了直接的实验证据。

#### 4.2 与其他植物中花青苷合成表观调控机制的比较

DNA甲基化作为植物花青苷合成的重要表观调控方式，在不同植物中呈现保守性与物种特异性并存的特点，本研究结果与拟南芥、葡萄、草莓等植物的相关研究既有共性，也存在物种特异性差异。

共性方面：在拟南芥、葡萄、草莓等植物中，花青苷合成相关转录因子基因启动子甲基化水平均与基因表达量、花青苷含量呈显著负相关，且甲基化抑制剂5-Aza处理均可降低甲基化水平，促进花青苷合成，本研究中苹果MdMYB10启动子的甲基化调控规律与上述研究一致，表明DNA甲基化对花青苷合成的负调控作用在植物中具有保守性；同时，不同植物中均存在甲基化修饰的环境响应性，光照、温度等环境因素可通过调控甲基化水平影响花青苷合成，体现了植物通过表观遗传修饰适应环境变化的共性机制。

物种特异性方面：不同植物中调控花青苷合成的核心甲基化类型存在差异，拟南芥、草莓中以CpG型甲基化为主，而本研究发现苹果中以CHG型甲基化为主，葡萄中则CpG和CHG型甲基化均发挥重要作用，该差异可能与不同植物的甲基转移酶家族基因表达特征相关；此外，不同植物中关键甲基化位点的分布区域不同，苹果MdMYB10的关键甲基化位点集中在转录起始位点上游200~800 bp，而葡萄MYBA1的关键甲基化位点位于上游1000~1500 bp，该差异可能与不同基因的顺式作用元件分布特征相关。

同时，与其他果树相比，苹果MdMYB10启动子甲基化的组织特异性更为显著，果肉组织甲基化水平远高于其他组织，这是导致苹果果肉花青苷积累量显著低于果皮的重要表观遗传原因，而葡萄、樱桃等果树的果肉和果皮甲基化水平差异较小，因此其果肉可积累较高含量的花青苷。

#### 4.3 本研究的创新点与局限性

##### 4.3.1 创新点

1.本研究系统揭示了苹果MdMYB10启动子CHG型甲基化的核心调控作用，明确了CHG型甲基化是调控基因表达和花青苷合成的主要甲基化类型，弥补了以往研究中甲基化类型调控特异性研究的不足。

2.首次在苹果MdMYB10启动子区域筛选并验证了3个与顺式作用元件重叠的关键甲基化位点，明确了甲基化修饰通过阻碍转录因子与顺式作用元件结合调控基因表达的分子机制，为苹果色泽品质改良提供了精准的分子靶点。

3.从组织、发育、环境三个维度系统分析了MdMYB10启动子甲基化的调控规律，构建了甲基化修饰-基因表达-花青苷合成的表观调控网络，完善了苹果花青苷合成的调控机制。

4.结合CRISPR/Cas9基因编辑技术和甲基化抑制剂处理，从体内和体外两个方面验证了关键甲基化位点的功能，为表观遗传修饰的功能验证提供了有效的技术方法。

##### 4.3.2 局限性

1.本研究仅选取了‘红富士’‘嘎啦’‘金帅’3个苹果品种为试材，品种数量有限，未对红肉苹果、观赏苹果等特殊色泽品种进行研究，后续需扩大种质资源范围，分析不同色泽类型苹果MdMYB10启动子甲基化的差异特征。

2.本研究仅探讨了DNA甲基化修饰对MdMYB10基因表达的调控作用，未考虑组蛋白修饰、非编码RNA调控等其他表观遗传修饰方式的协同作用，苹果花青苷合成的表观调控网络仍需进一步完善。

3.本研究的基因编辑和甲基化抑制剂处理均为离体或短期处理，未开展田间长期定位试验，其在生产实践中的应用效果和稳定性仍需进一步验证。

4.本研究未深入探讨环境因素调控MdMYB10启动子甲基化的信号传导途径，光照、ABA等环境信号如何通过下游通路调控甲基转移酶/去甲基化酶的活性，进而改变甲基化水平，仍需进一步深入研究。

#### 4.4 对苹果色泽改良的启示

本研究明确了MdMYB10启动子甲基化修饰对苹果果皮花青苷合成的核心调控作用，筛选出了关键甲基化位点，

为苹果色泽品质的分子改良提供了新的思路、靶点和技术支撑,主要体现在育种和栽培两个方面:

#### 4.4.1 分子育种方面

1.分子标记辅助育种:将筛选出的3个关键甲基化位点作为苹果色泽品质改良的DNA甲基化分子标记,在苹果育种早期世代对育种材料进行甲基化水平检测,快速筛选出甲基化水平低、花青苷积累能力强的优良单株,提高育种效率,缩短育种周期。

2.基因编辑育种:以3个关键甲基化位点为精准靶点,利用CRISPR/Cas9等基因编辑技术对黄色、粉色苹果品种的MdMYB10启动子进行定点去甲基化突变,定向改良苹果果皮色泽,培育色泽鲜艳的苹果新品种,该方法具有靶向性强、效率高、遗传稳定的优点。

3.种质资源创新:对苹果种质资源进行MdMYB10启动子甲基化水平全基因组扫描,筛选出甲基化水平低、花青苷积累能力强的优异种质资源,为苹果色泽育种提供丰富的亲本材料。

#### 4.4.2 栽培管理方面

1.优化光照和温度管理:根据本研究结果,正常光照可降低MdMYB10启动子甲基化水平,促进花青苷合成,因此在苹果着色期应采取摘叶、转果等栽培措施,增加果实的光照面积和光照时间;同时,着色期应避免低温胁迫,保持适宜的温度(20~25℃),防止甲基化水平上升抑制花青苷合成。

2.外源激素调控:在苹果着色期喷施适宜浓度的ABA(100 μmol/L),可通过降低MdMYB10启动子甲基化水平,促进MdMYB10基因表达和花青苷积累,改善果实色泽,该方法操作简单、成本低,可在生产中大面积推广应用。

3.甲基化抑制剂的应用:筛选高效、低毒的DNA甲基化抑制剂(如5-Aza),在苹果着色期进行外源喷施,通过降低启动子甲基化水平,定向促进花青苷合成,为苹果色泽的栽培调控提供新的技术手段。

此外,本研究结果也为其他果树的色泽品质改良提供了参考,可将DNA甲基化修饰作为果树色泽改良的重要靶点,开展相关研究和应用。

## 5 结论与展望

### 5.1 研究结论

本研究以不同色泽苹果品种为试材,采用BS-Seq、qRT-PCR、HPLC等技术,结合生物信息学分析和CRISPR/Cas9基因编辑技术,系统探究了MdMYB10启动子

甲基化修饰对苹果果皮花青苷合成的表观调控机制,得出以下主要结论:

1.克隆获得了‘红富士’‘嘎啦’‘金帅’3个苹果品种的MdMYB10启动子序列,序列一致性达99.5%以上,该启动子区域包含多种顺式作用元件,其中光响应元件、ABA响应元件、MYB结合位点为核心元件,且在转录起始位点上游200~800 bp存在CpG岛高频甲基化区域。

2.MdMYB10启动子甲基化修饰存在显著的组织特异性、发育动态性和环境响应性:果肉组织甲基化水平最高,果皮随果实发育甲基化水平逐渐下降;正常光照、ABA处理可降低甲基化水平,遮阴、低温处理可提高甲基化水平,且均以CHG型甲基化为主。

3.MdMYB10启动子甲基化水平与基因表达量、果皮花青苷含量呈极显著负相关,其中CHG型甲基化的抑制作用最为显著,是调控基因表达和花青苷合成的核心甲基化类型。

4.在MdMYB10启动子高频甲基化区域筛选出3个与顺式作用元件重叠的关键甲基化位点(M1、M2、M3),对其进行定点去甲基化突变或5-Aza去甲基化处理,可显著提高MdMYB10基因表达量和果皮花青苷含量,3个位点具有协同调控作用。

5.明确了MdMYB10启动子甲基化修饰调控苹果果皮花青苷合成的分子机制:甲基化修饰(尤其是CHG型)通过阻碍转录因子与顺式作用元件的结合,抑制MdMYB10基因的转录起始,进而降低基因表达量,抑制花青苷合成;而环境因素可通过调控甲基化水平改变基因表达状态,最终影响花青苷积累。

本研究首次系统揭示了苹果MdMYB10启动子甲基化修饰的调控规律和分子机制,为苹果色泽品质的分子改良提供了理论依据、精准分子靶点和技术支撑,同时也丰富了植物花青苷合成的表观遗传调控网络。

### 5.2 研究展望

基于本研究结果,结合当前苹果表观遗传学和分子育种的研究进展,未来可从以下几个方面开展深入研究:

1.扩大种质资源范围,分析甲基化的品种特异性:选取红肉苹果、观赏苹果、地方品种等不同色泽类型的苹果种质资源,开展MdMYB10启动子甲基化水平的全基因组扫描,分析不同色泽类型苹果甲基化的品种特异性和遗传规律,筛选优异的甲基化基因型种质资源,为苹果色泽育种提供丰富的亲本材料。

2.深入研究多表观遗传修饰的协同调控机制:开展DNA甲基化与组蛋白修饰(如H3K4me3、H3K27me3)、非编码

RNA (如miRNA、lncRNA)的协同调控研究,明确不同表观遗传修饰方式在调控MdMYB10基因表达和花青苷合成过程中的相互作用关系,构建完整的苹果花青苷合成表观调控网络。

3.探究环境因素调控甲基化的信号传导途径:深入研究光照、ABA、温度等环境信号调控MdMYB10启动子甲基化的分子机制,筛选调控甲基化的关键信号通路基因和甲基转移酶/去甲基化酶基因,明确环境信号与甲基化修饰之间的调控关系,为苹果色泽的精准栽培调控提供理论基础。

4.开展基因编辑和甲基化调控的田间应用研究:以筛选出的关键甲基化位点为靶点,开展CRISPR/Cas9基因编辑育种的田间定位试验,验证编辑材料的色泽改良效果和遗传稳定性;同时,筛选高效、低毒、易降解的甲基化抑制剂和植物生长调节剂,开展田间喷施试验,优化施用浓度、时期和方法,形成苹果色泽改良的配套栽培技术,应用于生产实践。

5.拓展至其他果树和园艺植物的色泽改良:将本研究建立的DNA甲基化调控研究方法和技术体系拓展至葡萄、樱桃、桃、草莓等其他果树和园艺植物,探究其花青苷合成的甲基化调控机制,为其他园艺植物的色泽品质改良提供参考,推动园艺植物表观遗传育种的发展。

6.开展甲基化修饰的表观遗传育种技术体系构建:结合分子标记辅助育种、基因编辑育种、表观遗传调控等技术,构建苹果色泽品质改良的表观遗传育种技术体系,实现苹果色泽的定向、精准改良,培育色泽鲜艳、品质优良的苹果新品种,提升我国苹果产业的核心竞争力。

#### 参考文献:

[1] 陈晓流, 束怀瑞. 苹果分子育种研究进展与展望 [J]. 中国农业科学, 2020, 53 (18): 3713-3726.

[2] 朱守亮, 王彩虹, 田义轲. 苹果 MYB 转录因子与花青苷

合成调控研究进展 [J]. 园艺学报, 2018, 45 (05): 977-988.

[3] 张艳敏, 孙清荣, 刘凤之. 苹果果皮花青苷合成的影响因素及调控机制 [J]. 果树学报, 2021, 38 (07): 1112-1124.

[4] 方智远, 刘忠松. 植物表观遗传学与作物育种 [J]. 中国农业科学, 2019, 52 (09): 1501-1513.

[5] Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals [J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11 (3): 204-220.

[6] Zhang X, Liu Y, Chen Y. DNA methylation regulates anthocyanin biosynthesis in apple peel by modulating MdMYB10 expression [J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70 (12): 3215-3228.

[7] Walker A R, Lee E, Reid J B. The role of MYB transcription factors in the regulation of flavonoid biosynthesis [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2019, 50: 7-15.

[8] 王晨, 高俊平, 姜闯道. 植物花青苷合成的表观遗传调控 [J]. 植物学报, 2020, 55 (02): 254-266.

[9] Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H. DNA methylation of the MYBA1 promoter is associated with white-flesh color in grape berry [J]. Plant and Cell Physiology, 2004, 45 (11): 1599-1609.

[10] 李娟, 陈学森, 沈向. 红肉苹果花青苷合成相关基因的克隆与表达分析 [J]. 林业科学, 2017, 53 (08): 53-61.

[11] Zhu J K. Epigenetic regulation of plant stress responses [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2016, 33: 110-117.

[12] 贺超兴, 张志斌. 表观遗传学技术在蔬菜作物育种中的应用 [J]. 中国蔬菜, 2022 (01): 1-8.

[13] Lang Z, Zhao Y, Wang X. CRISPR/Cas9-mediated editing of the MdMYB10 promoter improves apple peel color [J]. Plant Cell Reports, 2022, 41 (5): 987-998.

[14] 陈昆松, 徐昌杰, 李鲜. 果实品质形成与调控的分子生理学研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48 (08): 853-868.

[15] Feng S, Jacobsen S E, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development [J]. Science, 2010, 330 (6004): 622-627.